

Transformasi Genetik Tembakau dengan Gen *Cold Shock Protein* melalui Perantara *Agrobacterium tumefaciens*

Seagames Waluyo¹, Sustiprijatno^{2*}, dan Suharsono³

¹Program Studi Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, Jl. Kamper Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

²Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: susti11@yahoo.com

³Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, LPPM, Institut Pertanian Bogor

Diajukan: 23 April 2013; Diterima: 26 Juli 2013

ABSTRACT

Genetic Transformation of Tobacco with *Cold Shock Protein* Gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Seagames Waluyo, Sustiprijatno, and Suharsono.

Cold shock protein (Csp) essential for organisms to survive in abiotic stress condition. *CspB* gene has been fused to ubiquitin promoter in the T-DNA region of pCambia 1300int, and introduced into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. This research had an objective to transform genetically *Nicotiana tabacum* cv. Samsun by *CspB* gene under the control of Ubiquitin promoter and NOS terminator mediated by *A. tumefaciens*. Leaf discs were co-cultivated with *A. tumefaciens* LBA 4404. Based on the number of hygromycin-resistant calli, the efficiency of transformation was 57.5%. In the selective medium containing 50 µg/l hygromycin, the efficiency of regeneration of transgenic shoots was 82.6%. Based on PCR analysis using primers corresponding to ubiquitin promoter and *CspB* gene, 18 putative tobacco transgenic containing *CspB* gene under the control of ubiquitin promoter.

Keywords: Tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Cold Shock Protein* (Csp), transformation, *Agrobacterium tumefaciens*.

ABSTRAK

Transformasi Genetik Tembakau dengan Gen *Cold Shock Protein* melalui Perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Seagames Waluyo, Sustiprijatno, dan Suharsono.

Cold shock protein (Csp) merupakan komponen penting dalam organisme untuk ketahanan terhadap kondisi cekaman abiotik. Gen ini telah disisipkan ke dalam promotor ubiquitin di daerah T-DNA dari pCambia 1300int, dan diintroduksi ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan transformasi genetik *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun dengan gen *CspB* di bawah kendali promotor pUbiquitin dan terminator NOS yang diperantarai *A. tumefaciens*. Potongan daun dikultivasi dengan *A. tumefaciens* LBA 4404. Hasil ketahanan kalus terhadap higromisin menghasilkan efisiensi transformasi sebesar 57,5%. Pada media seleksi yang mengandung 50 mg/l higromisin, dihasilkan efisiensi regenerasi tunas

calon transgenik sebesar 82,6%. Analisis PCR menggunakan primer yang menempel pada promotor ubiquitin dan gen *Csp* menunjukkan 18 tembakau putatif transgenik mengandung gen *CspB*.

Kata kunci: Tembakau (*Nicotiana tabacum*), *Cold Shock Protein* (Csp), transformasi, *Agrobacterium tumefaciens*.

PENDAHULUAN

Transformasi genetik digunakan secara luas untuk mempelajari fisiologi, genetik dan perkembangan biologi tanaman. *Agrobacterium tumefaciens* banyak sekali digunakan untuk melakukan transformasi genetik tanaman. Transformasi dengan bakteri ini mempunyai keuntungan di antaranya adalah efisiensi transformasi tinggi, jumlah salinan gen sedikit yang tersisip ke dalam genom tanaman, dan dapat mentransferkan gen berukuran besar (Hiei dan Komari, 2008). Tanaman *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, dan *Oryza sativa* ssp. *japonica* untuk mempelajari fungsi dan peranan suatu gen.

Tembakau merupakan tanaman dikotil dan inang alami untuk *A. tumefaciens* (Mayo *et al.*, 2006). *N. tabacum* (Mayo *et al.*, 2006; Bhatti dan He, 2009) dan *N. benthamiana* (Anggraito, 2012) merupakan jenis tembakau yang sering digunakan dalam transformasi genetik. Pada jenis *N. tabacum* seperti Samsun (Stanic *et al.*, 1999), SRI (Bhatti dan He, 2009), Bright yellow (An, 1985), Xanthi (Su, 2012), dan Kasturi (Miswar, 2005), telah berhasil dilakukan transformasi melalui perantara *A. tumefaciens*. Daun muda (Jones, 1996; Su *et al.*, 2012) dan suspensi sel (An, 1985; Mayo *et al.*, 2006) merupakan eksplan yang telah berhasil diintroduksi gen asing. Keberhasilan transformasi genetik tembakau telah digunakan untuk berbagai tujuan seperti mengungkap regulasi sistem biologi tanaman (Langbecker *et al.*, 2004), bioremediasi untuk merkuri (He *et al.*, 2001), tanaman model untuk pengujian cekaman biotik (Waigman *et al.*, 2000), dan abiotik (Rizhsky *et al.*, 2002).

RNA mempunyai banyak daerah yang lestari dan fleksibilitas tinggi sehingga mudah mengalami salah pelipatan (*misfolding*) yang disebabkan oleh cekaman abiotik (Herschlag, 1995; Schroeder *et al.*, 2004; Chowdhury *et al.*, 2006). mRNA mudah membentuk jepit rambut (*hairpin*) pada posisi tidak sewajarnya (Kang *et al.*, 2013). Protein seperti *splicing-deficient group-I-intron* (SptA), *nucleocapsid protein* (NCp7), La protein, *Hfq* protein, dan *cold shock protein* (Csp) dapat melindungi RNA dari kesalahan melipat (Schroeder *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2013).

RNA-chaperone seperti Csp berfungsi untuk melindungi RNA dari kesalahan melipat (Schroeder *et al.*, 2004). Protein Csp mempunyai daerah untuk menempel, yaitu pada daerah RNA dan Y-box (Ermolenko dan Makhatadze, 2002). Gen *Csp* mempunyai daerah lestari yang disebut *cold shock domain* (Csd) pada semua organisme dengan panjang 200 pb yang menyandikan 67 asam amino dengan berat molekul 7,37 kDa (Willmsky *et al.*, 1992; Nakaminami *et al.*, 2006).

Gen *Csp* terinduksi pada kondisi panas (Perl *et al.*, 2000) dan dingin (Kim *et al.*, 2009) untuk melindungi RNA. Gen *Csp* telah berhasil diisolasi dari berbagai organisme, seperti *Bacillus subtilis* (Willmsky *et al.*, 1992), *Escherichia coli* (Yamanaka, 1999), gandum (Nakaminami *et al.*, 2006), dan *Arabidopsis thaliana* (Kim *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Gen *Csp* dari *B. subtilis* dan *B. caldolyticus* mampu diinduksi pada kondisi panas (Perl *et al.*, 2000).

Gen *Csp B. subtilis* telah dimasukkan ke dalam tanaman *A. thaliana*, padi dan jagung. Ekspresi gen *Csp* dalam tanaman transgenik menyebabkan peningkatan ketahanan terhadap berbagai cekaman abiotik. *A. thaliana*, jagung, dan padi yang mengekspresikan gen *Csp* dari *B. subtilis* mempunyai ketahanan terhadap suhu dingin, kekeringan dan panas (Castiglioni *et al.*, 2008; Service, 2009). Protein Csp berlokasi di sitoplasma, retikulum endoplasma (ER) dan inti sel (Castiglioni *et al.*, 2008; Nakaminami *et al.*, 2006).

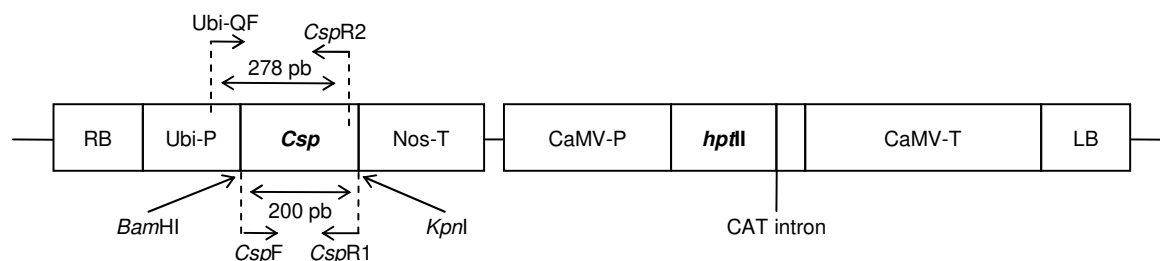
Gen *Csp* telah berhasil disisipkan ke dalam pCambia 1300int di bawah kendali promotor ubiquitin membentuk plasmid pCambia 1300int-*CspB*. Plasmid pCambia 1300int-*CspB* ini telah berhasil dimasukkan ke dalam *A. tumefaciens* LBA 4404 (Santoso, komunikasi pribadi). Untuk menguji peranan gen *Csp* dalam toleransi tanaman terhadap cekaman panas, maka gen ini diintroduksi ke dalam genom tembakau. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi transformasi genetik *N. tabacum* L. cv. Samsun dengan gen *CspB* di bawah kendali promotor pUbiquitin dan terminator NosT yang diperantarai *A. tumefaciens*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, dari Juli 2012 sampai Pebruari 2013.

Tanaman *N. tabacum* L. cv. Samsun yang diperoleh dari Prof. Dr. Ir Suharsono, DEA (Program Pasca-sarjana Bioteknologi, IPB) digunakan sebagai tanaman yang ditransformasi. *A. tumefaciens* LBA 4404 yang mengandung pCambia 1300int-*CspB* digunakan sebagai perantara untuk transformasi genetik tembakau. Vektor pCambia 1300int didapatkan dari Emmanuel Guiderdoni (CIRAD, France). Selain mengandung gen *Csp*, plasmid ini mengandung gen penanda seleksi *hptII* (Gambar 1).

Primer UbiQF: 5'-TGATGGCCCTGCCTTCATACG-3' dan CspR2: 5'-ACGTTAGCAGCTTGTGGTC-3' digunakan untuk menganalisis integrasi gen *CspB* di dalam tanaman tembakau transgenik. Posisi primer UbiQF dan CspR2 berada di ujung promotor ubiquitin dan gen *Csp* yang berukuran 287 pb di daerah T-DNA. Amplifikasi DNA aktin dengan PCR untuk mengetahui adanya DNA total tanaman dilakukan dengan primer aktin F: 5'CCTCTTAACCCGAAGGCTAA-3' dan aktin R: 5'GAAGGTTGAAAAGGACT TC-3' (Salkol *et al.*, 2007) dengan ukuran 600 pb.



Gambar 1. Peta daerah T-DNA pada plasmid pCambia 1300int-*CspB*. RB = right border, NOS-T = terminator napoline sythase, Csp = cold shock protein, Ubi-P = promotor ubiquitin, CaMV-P = promotor CaMV, CaMV-T = terminator CaMV.

Sumber: Santoso (komunikasi pribadi).

Konfirmasi Gen *Csp* Menggunakan Analisis PCR Koloni

Amplifikasi gen *Csp* yang terdapat di daerah T-DNA dari pCambia 1300int-*CspB* di dalam koloni *A. tumefaciens* LBA 4404 menggunakan primer CspF: 5'-ACGTTAGCAGCTTGTGGTC-3' dan CspR1: 5'-GCGGTACCTT-ACGCTTCTTTAGTAACGTTAGCA-3' yang berukuran 200 pb (Santoso *et al.*, data tidak dipublikasi). Komposisi PCR terdiri atas 1 koloni tunggal, 1x bufer PCR, 0,2 mM dNTP *mix*, 1,25 pmol setiap primer UbiQF dan CspR, dan 2,3 unit *Taq polymerase* (Generay Biotech) ditambahkan ddH_2O hingga volume total reaksi 20 μl . PCR dilakukan di dalam mesin *thermal cycle* (MJ Research) dengan program PCR terdiri atas denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan 63°C selama 15 detik, pemanjangan 72°C selama 30 detik dengan 20 siklus. Hasil amplifikasi PCR dimigrasikan di gel agarosa di dalam larutan penyangga 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM asam asetat, dan 1 mM EDTA) selama 30 menit kemudian direndam pada EtBr selama 10 menit dan diamati di bawah lampu UV.

Konfirmasi Gen *Csp* Menggunakan Enzim Restriksi

Koloni *E. coli* yang mengandung pCambia 1300int-*CspB* tunggal ditumbuhkan di dalam 5 ml media LB (10 g/l pepton, 10 g/l kamir, dan 5 g/l NaCl) cair yang mengandung 30 mg/l kanamisin pada suhu 37°C selama 12 jam pada *shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Plasmid diisolasi dengan menggunakan metode alkali (Sambrook dan Russel, 2001). pCambia 1300int-*CspB* dipotong dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Kpn*II. Komposisi reaksi pemotongan pCambia 1300intr-*CspB* reaksi terdiri atas 200 ng DNA plasmid, 1x bufer *Bam*HI; 1x bufer *Kpn*II; 10 unit *Bam*HI; dan 10 unit *Kpn*II dalam 50 μl volume total. Reaksi pemotongan diinkubasi di suhu 37°C selama 3 jam. Hasil amplifikasi PCR dimigrasikan di gel agarosa di dalam larutan penyangga 1x TAE selama 30 menit kemudian direndam pada EtBr selama 10 menit dan diamati di bawah lampu UV.

Persiapan Bahan Tanam dan *Agrobacterium tumefaciens*

Biji tembakau cv. Samsun disterilisasi dengan 5% NaOCl selama 1 menit kemudian dicuci dengan air steril. Biji ditumbuhkan pada media Murashige dan Skoog (1962) selama 10 minggu. Daun dipotong dengan ukuran 5 mm x 10 mm, kemudian diprekultur selama 1 jam, sebagai eksplan. Koloni tunggal *A. tumefaciens* LBA 4404 yang mengandung pCambia 1300int-*CspB* ditumbuhkan di dalam 5 ml media YEP (*yeast extract pepton* 10 g/l pepton, 10 g/l kamir dan 5 g/l NaCl) yang mengandung 50 mg/l antibiotik kana-

misin dan 30 mg/l rifampisin, dikocok *dishaker* pada kecepatan 150 rpm pada suhu 28°C selama 2 hari. Bakteri disegarkan dengan menumbuhkan 5 μl suspensi bakteri di dalam 50 ml media dengan kondisi yang sama hingga $\text{OD}_{600} = 0,5$.

Inokulasi, Kokultivasi, Seleksi, dan Regenerasi

Inokulasi dilaksanakan dengan merendam eksplan tembakau dalam suspensi *A. tumefaciens* selama 30 menit. Setelah inokulasi, eksplan diletakkan di atas kertas saring hingga kering, kemudian eksplan ditanam di media kokultivasi (MS yang mengandung 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l IAA, dan 300 μM asetosiringon) dan diinkubasi pada kondisi gelap selama 3 hari.

Eksplan dari media kokultivasi dicuci dengan media MS kemudian ditanam pada media induksi kalus yang juga merupakan media seleksi, yaitu MS yang mengandung 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l IAA, 20 mg/l higromisin B, 100 mg/l vankomisin dan 400 mg/l sefotaksim. Kalus yang tumbuh kemudian dipindahkan ke media regenerasi, yaitu MS yang mengandung 50 mg/l higromisin dan 250 mg/l sefotaksim. Tunas yang muncul dipisahkan dari kalus dan ditanam pada media perakaran, yaitu MS yang mengandung 50 mg/l higromisin. Tunas yang berakar dipindahkan ke media tanah.

Analisis Molekuler Tanaman Tembakau Transgenik T_0 dengan PCR

DNA total diisolasi dari daun tanaman *in vitro* yang berumur 10 minggu dengan metode Dellaporta *et al.* (1983). DNA dilarutkan dalam ddH_2O . Konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific). DNA diencerkan hingga konsentrasinya 100 ng/ μl untuk analisis molekuler dengan PCR.

Amplifikasi DNA transgen dilakukan dengan PCR menggunakan primer UbiQF: 5'-TGATGGCCCTGCCTT CATACG-3' dan CspR2: 5'-ACGTTAGCAGCTTGTGGTC-3' yang berukuran 278 pb. Komposisi PCR untuk mengetahui integrasi promotor ubiquitin dan gen *Csp* terdiri atas 500 ng DNA total, 1x bufer PCR, 0,2 mM dNTP *mix*, 1,25 pmol setiap primer UbiQF dan CspR, 2,3 unit *Taq polymerase* (Generay Biotech) dan ditambah dengan ddH_2O hingga volume total reaksi 20 μl . PCR dilakukan di dalam mesin *thermal cycle* (MJ Research) dengan program PCR terdiri atas denaturasi 94°C selama 30 detik, penempelan 55°C selama 15 detik, pemanjangan 72°C selama 30 detik dengan 20 siklus. Hasil amplifikasi PCR dimigrasikan di gel agarosa di dalam larutan penyangga 1x TAE selama 30 menit kemudian direndam pada EtBr selama 10 menit dan diamati di bawah lampu UV.

Uji Segregasi Gen *hptII* di dalam Tembakau Transgenik T_1

Biji tembakau transgenik T_1 disterilisasi dengan 5% NaOCl selama 1 menit kemudian dicuci dengan 30% etanol (v/v) selanjutnya dengan air steril. Benih kemudian disebar pada media MS yang mengandung 50 mg/l higromisin selama 21 hari. Analisis khi-kuadrat (*Chi-square*) dilakukan untuk menentukan rasio segregasi pada kecambah T_1 pada tembakau transgenik Csp. Analisis integrasi gen Csp di bawah kendali promotor ubiquitin dilakukan seperti pada tanaman T_0 .

Analisis Molekuler Tembakau Transgenik T_1 dengan PCR

DNA total diisolasi dari kecambah tembakau *in vitro* yang berumur 5 minggu dengan metode Dellaporta *et al.* (1983). DNA dilarutkan dalam ddH_2O . DNA diencerkan 1/10 (v/v) dari DNA total kemudian dilakukan analisis molekuler dengan PCR. Analisis integrasi gen *CspB* di bawah promotor ubiquitin dilakukan seperti pada tanaman T_0 .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Transformasi Genetik

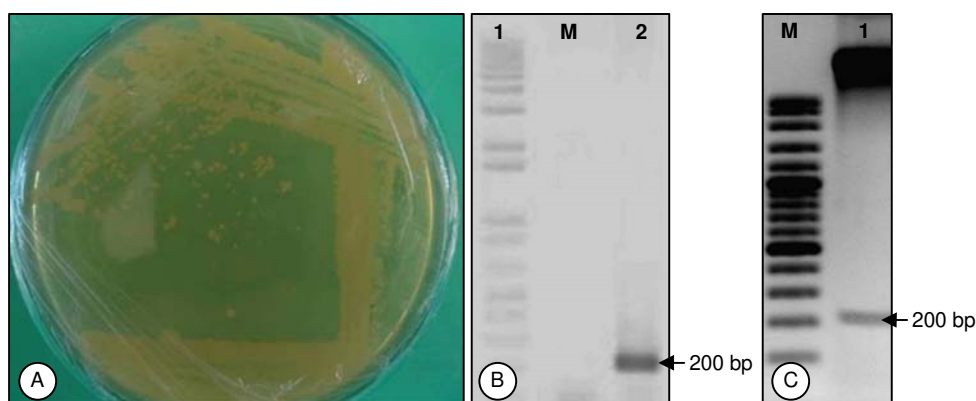
Nicotiana tabacum L. Samsun dengan Gen *Csp*

Untuk memastikan bahwa *A. tumefaciens* yang akan digunakan untuk menginokulasi potongan daun tembakau mengandung gen *CspB*, maka PCR dilakukan terhadap koloni bakteri ini (Gambar 2A) dengan menggunakan primer Csp. Hasil PCR menunjukkan bahwa *A. tumefaciens* mengandung gen *CspB* (Gambar 2B). Hasil ini dikonfirmasi dengan memotong plasmid pCambia 1300int-*CspB* dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Kpn*II yang menghasilkan fragmen berukuran

an 200 pb (Gambar 2C). Hasil ini menunjukkan bahwa *A. tumefaciens* LBA4404 mengandung plasmid pCambia 1300int-*CspB* dan dapat digunakan untuk mengintroduksi gen *CspB* ke dalam tanaman tembakau.

Transformasi genetik tembakau kultivar Samsun dilakukan dengan menggunakan eksplan yang berupa potongan daun. Potongan daun yang telah diinokulasi dengan *A. tumefaciens* ditanam pada media penginduksi kalus yang sekaligus berfungsi sebagai media seleksi I. Pada media seleksi I yang mengandung 20 mg/l higromisin, dari 40 eksplan yang diinokulasi *A. tumefaciens*, hanya 27 eksplan (atau 67,5%) yang membentuk kalus yang dapat bertahan hidup yang kemudian disebut dengan kalus transgenik putatif. Pada media yang sama, semua eksplan yang sebelumnya tidak diinokulasi oleh *A. tumefaciens* tidak membentuk kalus dan mengalami kematian pada minggu ketiga (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 20 mg/l higromisin dapat digunakan untuk membedakan kalus transgenik dan non transgenik.

Untuk memastikan bahwa kalus yang hidup di media induksi kalus yang juga berfungsi sebagai media seleksi I adalah transgenik, maka kalus tersebut dipindahkan ke media seleksi II yang juga berfungsi untuk regenerasi dengan menaikkan konsentrasi higromisinnya hingga 50 mg/l. Dari 27 kalus yang hidup di media seleksi I, 23 kalus dapat bertahan hidup di media seleksi II yang mengandung 50 mg/l higromisin. Seleksi bertingkat ini dimaksudkan untuk mendapatkan tanaman transgenik yang benar-benar mengandung gen *CspB*, bukan *escape*. Seleksi bertingkat juga telah dilakukan oleh (Dewanti *et al.*, 2011; Anggraito, 2012; Eksundari, 2012; Hannum, 2012).



Gambar 2. Konfirmasi keberadaan gen *Csp* di dalam *A. tumefaciens*. A = biakan *A. tumefaciens* di media YEP padat, B = hasil PCR koloni, M = marker 1 kb plus, 1 = *A. tumefaciens* yang mengandung pCambia 1300int, 2 = *A. tumefaciens* yang mengandung pCambia 1300int-*CspB*. C = hasil pemotongan pCambia 1300int-*CspB* dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Kpn*II, M = 1 kb plus, 1 = pCambia 1300int-*CspB* yang dipotong *Bam*HI dan *Kpn*II.

Konsentrasi 50 mg/l higromisin biasa digunakan untuk menyeleksi tanaman transgenik yang mengandung gen penanda seleksi *hpt* (Anggraito, 2012; Su *et al.*, 2012). Berdasarkan jumlah kalus yang tahan terhadap higromisin di media seleksi II, efisiensi transformasi pada penelitian ini adalah 57,5%. Efisiensi transformasi pada penelitian ini lebih rendah daripada efisiensi transformasi pada penelitian lain. Anggraito (2012) dan Hannum (2012) memperoleh efisiensi transformasi masing-masing 79 dan 82% pada *N. benthamiana*. Walaupun demikian, efisiensi transformasi pada penelitian ini lebih tinggi daripada yang diperoleh Eskundari (2012) yang hanya mendapatkan 16%.

Kalus yang hidup di media seleksi II, setelah 3 minggu beregenerasi membentuk tunas transgenik putatif. Tunas ini kemudian dipisahkan dari kalus dan ditumbuhkan di media yang sama untuk menginduksi pembentukan akar. Setelah akar terbentuk dan tinggi tunas mencapai lebih dari 5 cm, tanaman transgenik dipindahkan ke media tanah di dalam pot dan disebut dengan tanaman transgenik generasi T_0 . Tanaman ini dibiarkan melakukan penyerbukan sendiri untuk menghasilkan biji T_1 (Gambar 3).

Dari 23 kalus yang bertahan hidup di media seleksi II yang juga merupakan media regenerasi, 19 kalus (82,6%) beregenerasi untuk menghasilkan tunas generasi T_0 . Rata-rata tunas yang terbentuk adalah 3 tunas tiap kalus. Semua eksplan yang tidak diinokulasi yang ditumbuhkan pada media non selektif mampu membentuk kalus dan tunas (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi media dan zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan dalam penelitian ini dapat digunakan untuk menghasilkan tanaman tembakau. Regenerasi dari kalus menjadi tunas sangat tergantung dari medianya. ZPT sangat berpengaruh terhadap proses regenerasi ini. Kombinasi sitokinin dan auksin sangat menentukan keberhasilan regenerasi. Selain itu, agen seleksi yang berupa antibiotik dapat menghambat proses regenerasi, sehingga pada beberapa penelitian, proses regenerasi dilakukan pada media yang tidak mengandung antibiotik (Kyojuka dan Shimamoto, 1991).

Analisis Molekuler Tanaman Transgenik T_0 dengan PCR

Analisis molekuler dilakukan pada 18 tembakau transgenik putatif yang berhasil diaklimatisasi. Analisis

Tabel 1. Jumlah eksplan yang membentuk kalus di media seleksi higromisin.

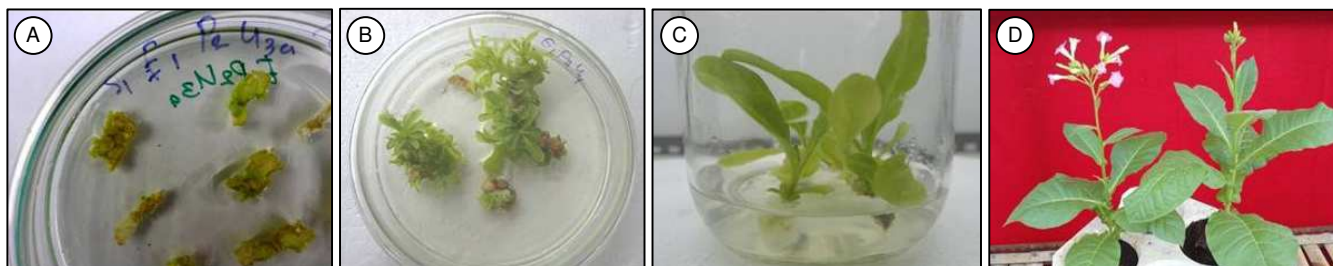
Perlakuan*	Jumlah eksplan	Jumlah eksplan yang membentuk kalus yang hidup di	
		Seleksi I (20 mg/l higromisin) ^a	Seleksi II (50 mg/l higromisin) ^b
Diinokulasi	40	27 (67,5%)	23 (57,5%)
Tidak diinokulasi	20	0	0
Tidak diinokulasi**	20	-	20 (100%)

* diinokulasi dengan *A. tumefaciens*, ** ditumbuhkan pada media non selektif yang tidak mengandung higromisin, ^a jumlah eksplan tahan di 20 mg/l higromisin + jumlah eksplan awal x 100%; ^b jumlah kalus tahan di 50 mg/l higromisin + jumlah kalus tahan di 20 mg/l higromisin x 100%.

Tabel 2. Tunas yang dihasilkan dari kalus pada dua perlakuan.

Perlakuan	Jumlah kalus	Jumlah kalus bertunas ^a	Jumlah tunas	Rataan tunas tiap kalus ^b
Diinokulasi*	23	19 (82,6%)	51	3
Tidak diinokulasi**	20	20 (100%)	100	10

* diinokulasi dengan *A. tumefaciens* dan ditumbuhkan pada media seleksi (50 mg/l higromisin), ** ditumbuhkan pada media non seleksi, ^a jumlah eksplan bertunas + jumlah eksplan tahan higromisin x 100%, ^b jumlah tunas total + jumlah eksplan yang bertunas.



Gambar 3. Perakitan tanaman tembakau transgenik yang mengandung gen *CspB*. A = eksplan di media seleksi I, B = kalus yang beregenerasi membentuk tunas transgenik, C = tunas transgenik di media pengakaran, D = tanaman tembakau transgenik T_0 .

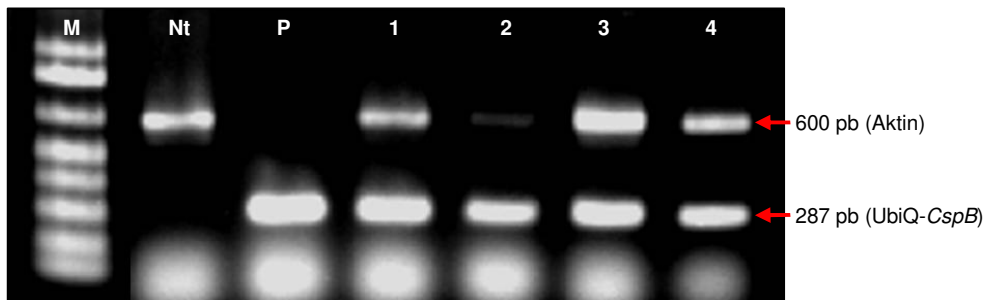
molekuler pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya integrasi gen *CspB* di bawah kendali promotor ubiquitin. Oleh sebab itu, PCR dilakukan dengan menggunakan primer yang mengamplifikasi daerah antara promotor ubiquitin (UbiQF) dan gen *CspB* (*CspR2*) yang berukuran 278 pb. Delapan belas DNA tembakau transgenik putatif menunjukkan keberadaan pita yang berukuran 278 pb (data tidak ditampilkan). Hasil amplifikasi dengan PCR dari 4 tanaman transgenik yang diambil secara acak menggunakan kombinasi primer1 (UbiQF dan *CspR2*) dan primer2 (aktinF dan aktinR) menunjukkan ukuran 287 pb dan 600 pb. Hasil PCR pada DNA tembakau transgenik putatif menunjukkan kesesuaian dengan pCambia 1300int-*CspB*. Gen aktin merupakan *house keeping gene* sehingga dapat digunakan sebagai kontrol internal PCR. Primer aktinF dan aktinR mampu mengamplifikasi dengan baik pada 5 DNA tembakau (4 tanaman putatif transgenik dan 1 tanaman non transgenik) yang berukuran 600 pb (Gambar 4).

Uji Segregasi Tembakau Transgenik *Csp* Samsun T_1

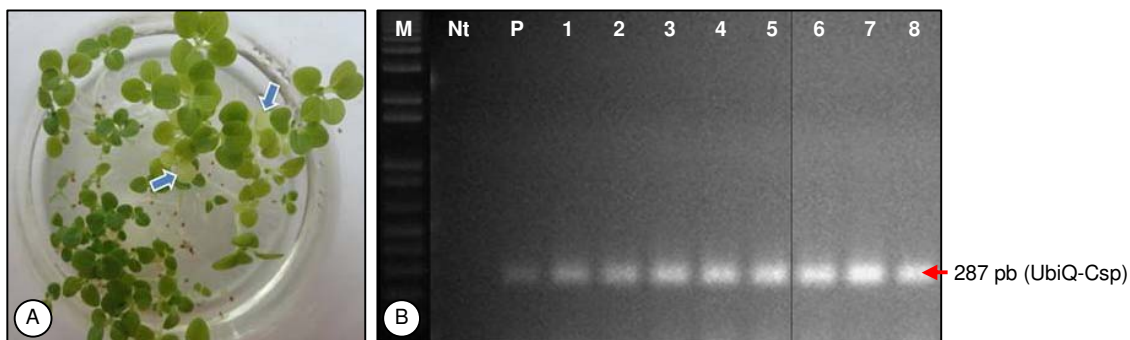
Pada umumnya, tanaman T_0 adalah homozigot sehingga pada biji T_1 adalah heterozigot sehingga tidak

semua biji transgenik. Hanya 75% dari populasi keturunannya (T_1) yang transgenik dan 25% non transgenik. Dari 75% yang transgenik, hanya 25% populasi tanaman yang transgenik homozigot dan 50% homozigot atau sama dengan rasio 3 : 1 (Henderson, 2009). Uji homosigotas generasi T_1 dilakukan dengan menumbuhkan biji di media 50 mg/l higromisin. Kecambah transgenik dan non transgenik dapat dibedakan secara jelas pada minggu ke-3. Kecambah non transgenik hanya mampu membentuk kotiledon yang selanjutnya mengalami klorosis. Kecambah transgenik mampu membentuk tembakau T_1 *in vitro* (Gambar 5a). Konsentrasi 50 mg/l higromisin telah digunakan untuk menyeleksi kecambah transgenik tembakau (Bhatti dan He, 2009; Anggraito, 2012) dan padi (Rachmawati *et al.*, 2004; Toki *et al.*, 2006).

Analisis segregasi dilakukan pada 4 genotipe T_1 tembakau transgenik yang diambil secara acak. Semua genotipe menghasilkan rasio keturunan 3 : 1 (resisten : sensitif higromisin). Hal ini menunjukkan bahwa tembakau transgenik mengandung gen *hpt* yang diwariskan dengan mengikuti pola pewarisan Mendel.



Gambar 4. Hasil PCR dengan primer UbiQ-CspB dan aktin. M = 100 bp DNA Ladder, Nt = tembakau non transgenik, P = plasmid pCambia 1300int-*CspB*, 1-4 = tembakau transgenik putatif.



Gambar 5. Analisis ketahanan pada tembakau transgenik T_1 dengan seleksi higromisin dan PCR kecambah resisten. A = representatif generasi T_1 pada media MS dengan 50 mg/l higromisin, B = analisis PCR gen *Csp* dari tembakau transgenik T_1 . M = 100 bp DNA ladder, Nt = tembakau non-transgenik, P = plasmid pCambia 1300int-*CspB*, 1 dan 2 = genotipe P1U4 1, 2, 3, dan 4 = genotipe P1U4 1, 4, 5, dan 6 = genotipe P1U4 6.1, 7 dan 8 = genotipe P1U4 6.2.

Tabel 3. Jumlah tembakau yang resisten dan sensitif terhadap higromisin dari generasi T₁ dengan pola segregasi gen *hpt*.

Genotipe	Jumlah tanaman generasi T ₁			χ^2	Rasio $\chi^2_{(1:0,5)} = 3,84$
	Total	Resisten higromisin	Sensitif higromisin		
P1U4 1.2	157	120	37	0,17	3 : 1
P1U4 1.4	32	27	5	1,5	3 : 1
P1U4 6.1	288	223	65	0,91	3 : 1
P1U4 6.2	161	130	31	2,83	3 : 1

Konfirmasi Gen *Csp* di Bawah Kendali Promoter Ubiquitin pada Tembakau T₁

Analisis PCR menggunakan primer UbiQF dan CspR2 yang berukuran 278 pb dilakukan terhadap 4 genotipe dari 2 kecambah yang resisten terhadap higromisin yang diambil secara acak. Hasil PCR dari 4 genotipe tembakau T₁ dan pCambia 1300int-*CspB* menghasilkan amplikon 287 pb sedangkan pada DNA tembakau T₁ non transgenik tidak menghasilkan amplikon (Gambar 4).

KESIMPULAN

Transformasi gen *CspB* yang diperantarai *A. tumefaciens* telah berhasil dilakukan. Tembakau transgenik putatif yang lolos seleksi di 50 mg/l higromisin adalah 57,7%. Delapan belas tanaman transgenik putatif yang dilakukan analisis PCR menunjukkan PCR positif. Analisis segregasi T₁ menunjukkan gen *CspB* telah diturunkan pada generasi T₁ dengan rasio 3 : 1 (resisten : sensitif higromisin).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. Tri Joko Santoso yang telah memberikan materi genetika berupa *A. tumefaciens* yang membawa pCambia 1300int-*CspB*.

DAFTAR PUSTAKA

- An, G. 1985. High efficiency transformation of cultured tobacco cell. *Plant Physiol.* 79:568-570.
- Anggraito, Y.U. 2012. Transformasi genetika *Nicotiana benthamiana* L. dan kedelai dengan gen *MaMt2* penyandi metallothionein tipe II dari *Melastoma malabathricum* L. Disertasi S3, Program Studi Biologi, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 71 hlm.
- Batti, K.H. and C. He. 2009. Agrobacterium mediated tobacco transformation with rice *fae* gene and segregation analysis of T₁ generation. *Pak. J. Bot.* 41(1):403-412.
- Castiglioni, P., D. Warner, R.J. Bensen, D.C. Anstrom, J. Harrison, M. Stoeker, M. Abad, G. Kumar, S. Salvador, R. D'Oridine, S. Nacarro, S. Back, M. Fernandes, J. Targollo, S. Dasgupta, C. Bonin, M.H. Luethy, and J.R. Heard. 2008. Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol.* 147(2):446-455.
- Chowdhury, S., C. Maris, F.H.T. Allain, and F. Narberhaus. 2006. Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer. *EMBO J.* 26:2487-2497.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 4:19-21.
- Dewanti, P., M. Islahuddin, P. Okviandari, S. Waluyo, B.A. Saputra, T. Wardiyati, dan B. Sugiharto. 2011. Efisiensi transformasi tomat (*Lycopersicon esculentum*) dengan gen *SoSPS1* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. *Berk. Penel. Hayati* 4(C):73-78.
- Ermolenko, D.N. and G.I. Makhatadze. 2002. Bacterial cold-shock proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 59:1902-1913.
- Eskundari, R.D. 2012. Transformasi genetika tanaman tembakau oleh Gen *LFY Kakao* (*TcLFY*) menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis S2, Program Studi Biologi, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 28 hlm.
- Hannum, S. 2012. Isolasi, pengklonan and analisis ekspresi gen penyandi *Copper-Zinc superoxide dismutase* (*Cu/Zn-SOD*) dari *Melastoma malabathricum* L. Disertasi S3, Program Studi Biologi, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 106 hlm.
- He, Y.K., J.G. Sun, X.Z. Feng, M. Czako, and L. Marton. 2001. Differential mercury volatilization by tobacco organs expressing a modified bacterial *merA* gene. *Cell Res.* 11:231-236.
- Henderson, M. 2009. 50 Genetic Ideas You Really Need to Know. Quercus Publishing. London. p. 8-11.
- Herschlag, D. 1995. RNA Chaperones and the RNA folding problem. *Biol. Chem.* 270(36):20871-20874.
- Hiei, Y. and T. Komari. 2008. Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature Protocols* 3(5):824-834.
- Jones, H. 1996. Plant gene transfer and expression protocols. *Methods Mol. Biol.* 49:39-48.

- Kang, H., S.J. Park, and K.J. Kwak. 2013. Plant RNA chaperones in stress response. *Trends Plant Sci.* 18(2):100-107.
- Kim, M.H., K. Sasaki, and R. Imai. 2009. Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Biol. Chem.* 284:23454-23460.
- Kyozuka, J. and K. Shimamoto. 1991. Transformation and regeneration of rice protoplast. *Plant Tiss. Cult. Manual* B2:1-17.
- Langbecker, C.L., G.N. Ye, D.L. Broyles, L.L. Duggan, C.W. Xu, P.T. Hajdukiewicz, C.L. Armstrong, and J.M. Staub. 2004. High-frequency transformation of undeveloped plastids in tobacco suspension cells. *Plant Physiol.* 135:139-146.
- Mayo, K.J., B.J. Gonzales, and H.S. Mason. 2006. Genetic transformation of tobacco NT1 cell with *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Prot.* 1:1105-1111.
- Miswar, B. Sugiharto, J. Soedarsono, dan S. Moeljopawiro. 2005. Transformasi *gen sucrose phosphate synthase* (*SoSPS1*) tebu (*Saccharum officinarum* L.) untuk meningkatkan sintesis sukrosa pada daun tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). *Berkala Ilmiah Biologi* 4(5):337-347.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15:473-497.
- Nakaminami, K., D.T. Karlson, and R. Imai. 2006. Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *PNAS* 103:10122-10127.
- Park, S.J., K.J. Kwak, T.R. Oh, Y.O. Kim, and H. Kang. 2009. Cold shock domain proteins affect seed germination and growth of *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 50(4):869-878.
- Perl, D., U. Mueller, U. Heinemann, and F.X. Schmid. 2000. Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nature Struct. Biol* 7(5):380-383.
- Rachmawati, D., T. Hosaka, E. Inoue, and H. Anzai. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of javanica rice cv. rojolele. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(6):1193-1200.
- Rizhsky, L., H. Liang, and R. Mittler. 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 130:1143-1151.
- Salkol, A., A. Kwiatkowska, A. Jerzmanowski, and M. Prymakowska-Bosak. 2007. Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and *Arabidopsis* cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. *Planta* 227:245-254.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual Third Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1:31-1.38
- Schroeder, R., A. Barta, and K. Semrad. 2004. Strategies for RNA folding and assembly. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5:908-919.
- Service, R.F. 2009. The promise of drought-tolerant corn. *Science* 326:517.
- Su, G., S. Park, S. Lee, and N. Murai. 2012. Low co-cultivation temperature at 20°C resulted in the reproducible maximum increase in both the fresh weight yield and stable expression of gus activity after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tobacco leaf disks. *Am. J. Plant Sci.* 3:537-545.
- Stanic, D., B. Strukelj, R. Strucl, T. Demsar, B. Reavy, H. Barker, and J. Zel. 1999. Transformation of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun by the coat protein gene of PVY^{NTN}. *Phyton (Horn, Austria)* 39(3):271-276.
- Toki, S., N. Hara, K. Ono, H. Onodera, A. Tagiri, S. Oka, and H. Tanaka. 2006. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant J.* 47:969-976.
- Waigman, E., M. Chen, R. Bachmair, S. Ghoshroy, and V. Citovsky. 2000. Regulation of plasmodesmal transport by phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein. *EMBO J.* 19:4875-4884.
- Willmsky, G., H. Bang, G. Fischer, and M.A. Marahiel. 1992. Characterization of CspB, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *J Bacteriol.* 174:6326-35.
- Yamanaka, K. 1999. Cold shock response in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(2):193-202
-